

特表平7-502723

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月23日

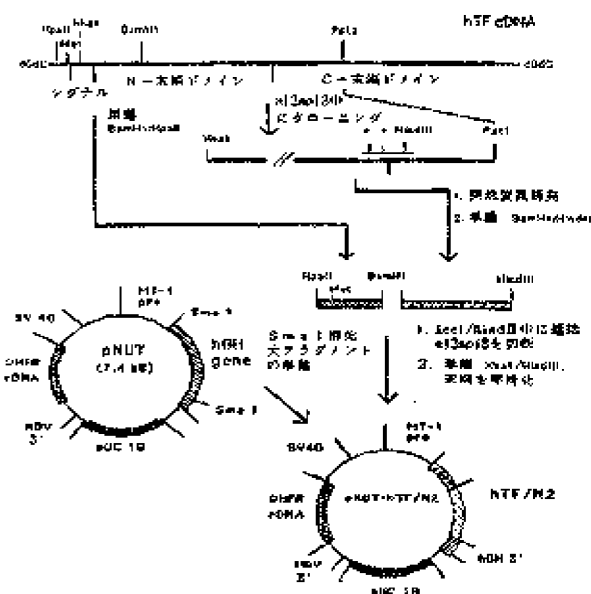
(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	
C 0 7 K 14/79		8318-4H		
A 6 1 K 38/16				
C 1 2 N 5/10				
		8314-4C	A 6 1 K 37/ 14	
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	ZNA A
		審査請求	未請求	予備審査請求
			有	(全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-505865	(71)出願人	ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・ アンド・ステイト・アグリカルチュラル・ カレッジ
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月6日		アメリカ合衆国バーモント州05405バーリ ントン(番地なし)
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)8月6日	(71)出願人	ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコ ロンビア
(86)国際出願番号	PCT/US92/00928		カナダ国ブリティッシュ・コロンビア・ バンクーバー(番地なし)
(87)国際公開番号	WO92/13550	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉
(87)国際公開日	平成4年(1992)8月20日		
(31)優先権主張番号	652, 869		
(32)優先日	1991年2月8日		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), CA, JP		

(54) 【発明の名称】 組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

(57) 【葬物】

金属-結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート治療に用いることができる。



## 摘 要 の 範 囲

1. 組み替えトランスフェリン。
2. 組み替えヒト血清トランスフェリン。
3. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含む、トランスフェリンの組み替え単一分子。
4. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
5. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシル末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
6. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、突然変異体の金属に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、突然変異体トランスフェリン単一分子。
7. 鉄に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、請求の範囲6に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
8. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然のトランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲7に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
9. トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の突出部の結合ドメインを含むトランスフェリン単一分子をコードする核酸を、真核細胞中の発現に用いた遺伝的調節要素と結合させて含む核酸構築物を含む、真核発現ベクター。
10. 核酸構築物がトランスフェリン又はトランスフェリン単一分子をコードする核酸に結合したトランスフェリンシグナル配列をコードする

## 明 細 書

組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

## 発明の背景

集合的にトランスフェリン又はシデロフィリンと呼ばれる鉄-結合グロブリンは、著しく限られた機能を有するタンパク質の種類を含む。ヒト血清トランスフェリン (Anderson, B. F. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1769-1773) 及びウサギ血清トランスフェリン (Bailey, S. et al., (1988) Biochem. J. 27: 580-5812) のX-線結晶学的分析は、これらのタンパク質が短い鎖構造により連結された2個の類似した突出部を含み、各突出部は金属イオン及び移動アニオンのための結合部位を含む深い裂け目を形成する2個のドメインを含むことを明らかにしている。

ニワトリオボトランスフェリン遺伝子が形質転換マウス中で発現され (McKnight, O. S. et al., (1983) Cell (Cambridge, MA) 34: 335-341)、マウストランスフェリンの一部とガラクトシダーゼの融合タンパク質が B. cell 中で発現された (Aldred, A. et al., (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 960-965)。この融合タンパク質を除き、同様にトランスフェリン又は分子の一部を発現する試みは不成功であった (Aldred, A. et al.,

併発を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。

11. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。

12. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシル末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。

13. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。

14. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞系。

15. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスフェクションされたペーパーハムスター腎臓細胞系。

16. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含むトランスフェリンの組み替え単一分子を、金属の濃度を下げるのに十分な量で患者に投与することを含む、金属キレート化治療の方法。

17. 金属が鉄である、請求の範囲16に記載の方法。

18. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する突然変異体である、請求の範囲17に記載の方法。

19. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲18に記載の方法。

20. 組み替えトランスフェリンを含む細胞培養媒体のための非血清補剤。

(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 960-965)。おそらくタンパク質の高密度に回転の構造及び分子内の多数のジスルフィド架橋がバクテリア宿主中の発現に対する主要な障害であろう。アルカリホスファターゼシグナル配列を付けたタンパク質をバクテリア発現系に向かわせることにより、天然のタンパク質の折り畳み速度を部分的に最小にする試みは不成功であった。

## 発明の要旨

本発明は組み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの1個の突出部 (アミノ末端又はカルボキシル末端) の金属-結合ドメインを含む組み替えトランスフェリン単一分子、及びトランスフェリンの発現のための安定な細胞培養系に関する。組み替えトランスフェリンは安定な形質転換された真核細胞、例えばペーパーハムスター腎臓細胞中で発現して全-又は半-分子の形態の基本的に均一な「単分散」試料を与えることができる。本発明は又、天然 (野鼠-型) の形態のトランスフェリンと異なる金属-結合性又は他の性質を有する突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子に関する。これらには鉄又は他の金属への結合が天然のトランスフェリンより強いあるいは弱いかである突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子が含まれる。

トランスフェリン単一分子は金属調節異常症又は金属中毒にかかった患者の治療のための金属キレート化治療に使用することができる。例えばトランスフェリン単一分子、特に天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する突然変異体をサラセミアなどの鉄-過剰負荷患者に投与し、その体から過剰の毒性の鉄を除去することができる。さらに半-分子又

は金属イオン選択性が与えられたその突然変異体を用いて他の特性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅又は亜鉛を体から除去することができる。

#### 図の説明

図1はpNUTにおけるhTF/2N複製ベクターの構造を示す。ヒト血清トランスフェリンをコードする2、3-キリのcDNAをヒト肝臓cDNAライブラリから単離し、完全アミノ末端ドメインコード配列を含む1、5-kbのPstI/HaeIフラグメントをM13mpl3中にクローニングする。二重鎖鎖停止コドン及びHindIII認識配列を特定部位の突然変異誘発により導入し、BamHI/HindIIIフラグメントの単離を可能にし、それがBamHI/HpaIフラグメントと結合するとアミノ末端ドメイン及びNゲル配列をコードした。このフラグメントを再複製ベクターpNUT中にクローニングし、ベクターpNUT-hTF/2Nを得た。このプラスミドにおいてトランスフェリンcDNAはメタロチオニンプロモーター(MT-1プロ)及びヒト成赤血球転写停止シグナル(hGH3')の制御下であり、pNUTはヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルを用いて噬菌体付着(cDNA/DNA)の感染を促進するSV40初期プロモーター(SV40)を含む。

図2は、種々のペーパーハムスター腎臓細胞系からの免疫沈降物のウェスタンブロットを示す。2n-胚嚢細胞胚嚢物からの細胞ライゼート(a)及び胎盤(b)の試料を抗-hTF抗血清を用いて沈降させた。対照的なベレットの試料をNaDodSO<sub>4</sub>-PAGEにより分離し、ユトロセルローズに移し、抗-hTF抗血清及びその後アムカリオスワ

ーター複合抗-igGを用いて染色させた。hGH-pNUT及びhTF/2N-pNUT細胞系を5.0×10<sup>6</sup>MのMTX中で選択し、DMEM/10%ウシ胎児血清中ですべての細胞を培養した。1列、BHK細胞；2列、hGH-pNUTトランスフェクションBHK細胞；3列、hTF/2N-pNUTトランスフェクションBHK細胞。分子重量マーカー(×10<sup>3</sup>)の位置をプロットの右に示し、追加の37, 900のタンパク質バンドの位置もプロットの右に示す(×37)。

図3はhTF/2Nの単離及びPAGE分離を示す。(パネルA)組み替えhTF/2N(上欄)及びタンパク質分解誘導hTF/2N(下欄)のPolyanion S1のカルム上におけるFPLC分離。

(パネルB)分子重量標準(MW)及びパネルAからのピークa-dの各8名のNaDodSO<sub>4</sub>-PAGE(アクリルアミドの5-12%均配)。(パネルC)FPLCピークa-d(組み替えhTF/2N)及びパネルAからのピークe-h(タンパク質分解誘導hTF/2N)の非還元条件下におけるウレア-PAGE。アポタンパク質(apo)及び鉄-結合タンパク質(fe)の位置を示す。FPLCで用いられた条件は材料及び方法にて示す。FPLC部分は以下のように集めた：ピークa(成分23-27)、ピークb(28-31)、ピークc(32-38)、ピークd(39-45)、ピークe(28-31)、ピークf(32-36)、ピークg(38-44)及びピークh(46-51)。

図4は1.0mMのFe(III)(NTA)を用いた主要形態の組み替えhTF/2Nの測定を示す。タンパク質の量は1、00mLの1.0mM NaHCO<sub>3</sub>中の3、68A<sub>280</sub>単位であった。酸素流路に鉄をそれぞれ加えた後5-10分間可視スペクトルを測定した。

図5は組み替えhTF/2Nの核磁気共鳴スペクトルを示す。(a)2H<sub>2</sub>Oのラインブロードニングを用いたフーリエ変換スペクトル。(b)4H<sub>2</sub>Oのラインブロードニング及びDC=4、0、NS=68500に与える回転差スペクトル(convolution difference spectrum)。タンパク質試料は<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O中の0、1M KCl、0、1mL中で8mgであった。

図6はm-Prtyr組み替えhTF/2Nの<sup>15</sup>N核磁気共鳴スペクトルを示す。図は1.0Mのラインブロードニング、NS=3、000を用いたフーリエ変換を示す。タンパク質試料は<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O中の0、1M KCl、0、1mL中で6mgであり、参照は<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O中の0、1Mの三フッ化酢酸であった。

図7はhTF/2Cコード配列の製造のためにPCRプライマーとして用いた2つの別々のオリゴヌクレオチドを示す。金カルボキシア末端のためのコード配列を含むEcoRI制限フラグメントを、25塩基のPCR増幅の終型として用いた。オリゴヌクレオチド1は3maI認識部位、及び天然のhTFシグナル配列をその5'末端に含み、その3'末端でhTFのアミノ酸234-241のコード配列と合致する。オリゴヌクレオチド2はhTF-cDNAの3'非翻訳領域の配列と合致し、この部位に第2の3maI認識配列を導入する。

#### 例の具体的な説明

本発明は組み替えトランスフェリン、組み替えトランスフェリン単一分子、及び天然のトランスフェリン分子と比較して金属-結合能の向上など、性質が変化した金-長トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子の突然変異体を与える。組み替えトランスフェリンは大量に、及

び実質的に等質の〈単分散〉形態で製造することができる。例えばヒト血清トランスフェリンの組み替え単一分子は、他のヒト血清タンパク質を実質的に含まない基底的に等質の試料として製造することができる。対照的にホロタンパク質のタンパク質分解により製造された単一分子は複製が困難で、実際にヒトトランスフェリンのカルボキシー末端部分をタンパク質分解の手段により限定に製造することはできない。組み替え法は、トランスフェリンの新規形態の設計及び製造に突然変異誘発を選択することも可能にする。

一般に本発明の組み替えトランスフェリンは、トランスフェリンをコードする複製構築物を用いて選んだ宿主細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション宿主細胞を培養に適した条件下で培養し、細胞により発現された組み替えトランスフェリンを回収することにより製造される。3種類のトランスフェリンのアミノ酸配列が報告された(Jackson, J. M. and Chambon, P. (1982) Eur. J. Biochem. **122**: 291-295; MacGillivray, R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**: 3543-3553; Meier-Boutigue, M.-M. et al. (1984) Eur. J. Biochem. **145**: 659-676; Rose, T. M. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 1261-1265; Baldwin, G. S. and Wornatlock, J. (1988) Nucleic Acids Res. **16**: 8720-8730)。ヒト血清トランスフェリンのcDNA配列が決定された(Yan, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. S

c4. U.S.A. 8,1:2752-2756)。組み替えトランスフェリンの製造のための全一長DNA又はトランスフェリンあるいはその一部のアミノ末端又はカルボキシー末端突出部のいずれかをコードする切断DNAを、利用できる供給源から得ることができるか、又は標準的方法により既知の順序に従って合成することができる。組み替えトランスフェリンを細胞培養中に分泌させるために、トランスフェリンシグナル配列（又は発現系に適した他のシグナル配列）をコードするDNAをトランスフェリンコードDNAの上流に置く。

トランスフェリン及びトランスフェリン半分子の突然変異体を、特定部位の突然変異誘発の標準的方法により製造することができる。Taylor et al. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 8749-8764; Zoller, M. J. and Smith, M. (1989) Meth. Enzymol. 169:458-500を参照。特に突然変異誘発を用いて天然のトランスフェリンと異なる金属結合性を有する突然変異体トランスフェリンを製造することができる。例えば、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合することができる突然変異体を製造することができる。そのような突然変異体の製造のためには、金属一結合ドメインの突然変異を誘発し、結合に含まれる1個又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換する。ヒト血清トランスフェリンの場合の金属キレート化のためのリガンドであるアミノ酸を下記に示す（アミノ酸の横の番号は一次配列中のアミノ酸残基の位置を示し、その場合成熟タンパク質の第1バランを位置1と決定する）。

アミノ末端突出部

カルボキシル末端突出部

体の酵素をコードする。これにより、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度（0.5 mM）のメトトレキサート中で直接選択することが可能になり、ジヒドロホレートレグクターゼの不足した受容性細胞株の必要を廃する。pBUTはpUC18複製配列を含む、それによりpBUTがE. coli中で増幅されて受容性細胞のトランスフェクションのために十分な量のプラスミドを与えることができる。

トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターは、適した宿主細胞中に挿入される。好ましい宿主細胞は、ベクターを用いて形質転換され、機能的に成熟したトランスフェリン構築物を発現する安定な細胞株を与えることができる単核細胞である。特に有用な細胞はペビーハムスター腎臓細胞である。ペビーハムスター腎臓細胞は、トランスフェリンをコードするDNA構築物を有するベクター（例えばpBUTなど）を用いてトランスフェクションされ、機能的に活性なトランスフェリン（全又は半分子）を発現し、分別する安定な細胞培養系を与えることができる。これらの細胞は経済的な大規模生産に十分適しており、容易に利用できる供給源から得ることができる。

リン酸カルシウム共沈又はエレクトロポレーションなどの標準的方法を用い、無依存性細胞をベクターでトランスフェクションすることができる。その後細胞を、トランスフェリンの発現を誘導するのに適した条件下で培養する。例えばpBUTベクターを用いてトランスフェクションしたペビーハムスター腎臓細胞を、腎臓の存在下で刺激し、トランスフェリン構築物を発現させることができる。ペビーハムスター腎臓細胞は、癌腫発生U1(ras<sup>+</sup> G16C)を約1%で含むDixsonの成胚性細胞株（Ham's F-12栄養剤

(アミノ酸1-837)		(アミノ酸842-679)	
アスパラギン酸	68	アスパラギン酸	392
チロシン	95	チロシン	426
チロシン	188	チロシン	519
ヒスチジン	249	ヒスチジン	584

他の種類のトランスフェリンの場合、番号が異なりリガンド（アミノ酸）は同一である。

トランスフェリンの他の領域は結合を制御し、これらも突然変異誘発の標的となることができる。通常これらは近接したアミノ酸、例えばリシン、ヒスチジン又はアルギニンである。例えば天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン半分子は、206位のリシン残基をグルタミンで置換することにより（AAG→CAG）製造することができる。

トランスフェリンコードDNAを、DNAの発現を指示するための適した調節要素を含む直後発現ベクター中にクローニングすることができる。好ましい直後発現ベクターはPamili et al. (1987) Cell 50:405-412により記載されたプラスミドpBUTである。このプラスミドはプロモーター領域、ターミネーター領域及びヒト成長ホルモンの転写停止シグナルの存在下におけるトランスフェリンコードDNAの転写を含む。さらにpBUTは、細胞培養物中における選択を可能にするためのヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルと共にSV40初期プロモーターの制御下にあるジヒドロホレートレグクターゼ遺伝子を含む。遺伝子は、鉄の過剰代謝トトレキサートに対する選択力（270倍近い突然変異

混合物の培地中で培養するのが好ましい）。

適した培養期間の後、発現され、分泌されたトランスフェリンを培地から回収することができる。標準的精製法を用いて組み替えトランスフェリンの実質的に等量の材料を得ることができる。1つの具体化の場合、培地中のトランスフェリンに鉄を飽和させ、その後アニオン交換クロマトグラフィーにより精製する。

本発明の組み替えトランスフェリンは、鉄又は他の過剰金属をキレート化し、体から除去するのに用いることができる。体内の鉄キレート化の通常の方法は、微生物起源の天然に存在する多様なシクロフォア及び合成鉄キレート剤を、その生理学的効果、主に鉄と結合して体から除去する能力に基づき評価することであった。このような化合物の多くが研究され、鉄の除去の能力は様々であり、多くの場合有害な副作用があった（Pill et al. (1978) J. Pharm. Exp. Therap. 208:12-18)。その結果、ヒトから過剰の鉄を除去するために用いられるキレート剤として、ストレプトミセス・ピロシス（Streptomycin pilosus）からの誘導ペプチドであるデフェロキサミンのみが残っている。

鉄キレート化治療に好ましいトランスフェリンは、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン半分子である。突然変異体半分子の初回により、金属のより有効なキレート化及び除去が可能になる。特に好ましい突然変異体半分子は、下記の表側に記載するK206Qであり、これは206位にリシンではなくグルタミンを含む。トランスフェリン半分子は、ホロタンパク質と異なり腎臓の糸球体を通過し、尿中に排泄され、従って金属がキレート化さ

れるのみでなく体から除去されるので有利である。さらに単体の単一分子は癌細胞の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの細胞に結合を誘導しない。さらにヒトトランスフェリンの単一分子はおそらくヒトの体により「自己」と認識され、従って免疫学的応答を引き起こさない。

さらに突然変異体単一分子は、金属イオン選択性が異なるように設計することができる。キレート化剤を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅及び亜鉛を体から除去することができる。

キレート化治療の場合、金属をキレート化して溶解度を毒性値以下に下げることにより十分な量で組み替えトランスフェリンを患者に投与する。一般にこれは生体学的に許容し得るレベル、例えば食塩水中で、希釈口咽経路で（典型的に静脈内）投与する。

組み替え単一ヒトトランスフェリンは、細胞培養増殖のための非血漿成分物中で使用することができる。トランスフェリンは成長細胞による鉄吸収に必要である。組み替えトランスフェリンの使用により、ヒト細胞から精製したトランスフェリンに伴う汚染物（例えばHIV又は肝炎ウィルス）の危険を避けることができる。

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。

#### 実施例

1. アミノ酸精製出部を含む組み替えトランスフェリン単一分子の製造

#### 材料

T4 DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI（クレンワフラグメント）及びT4ポリヌクレオチドキナーゼは、Pharmacia-PL

58（8389-8394）中に精製されたヒト肝臓cDNAライブラリを、血清hTFのアミノ末端8アミノ酸をコードする合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドはYang, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:2752-2758により報告されたhTF cDNA配列のヌクレオチド88-111に対応した。オリゴヌクレオチドはす4ポリヌクレオチドキナーゼ及び<sup>32</sup>P-ATPを用いて末端-標識し（Chacones, G. and van de Sande, J. H. (1980) Methods Enzymol. **68**:75-85）、約10<sup>6</sup>個のコロニーのスクリーニングに用いた。陽性のコロニーの制限エンドヌクレアーゼマッピング及びcDNA配列分析を、それぞれ0.19及びM13mp19ベクターを用いて機能的に行った（Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1983) Methods Enzymol. **101**:20-78; Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467）。

発現ベクター及び細胞培養 異接発現ベクターpNUT（Palmiter, R. D. et al. (1987) Cell (Cambridge, MA) **50**:435-443）及びペーハムスター腎臓（BRK）細胞はDr. Richard D. Palmiter (Iowa

Biochemicalsから購入した。制限エンドヌクレアーゼはPharmacia PL Biochemicals及びBethesda Research Laboratoriesから購入した。オリゴデオキシリボヌクレアーゼは、Applied Biosystems 980A DNA合成機上で合成した。ミトセルロースフクターは、Schleicher and Schuellから、<sup>32</sup>P-標識ヌクレオチドはNew England Nuclearから、ヒツジ抗-ヒトトランスフェリン抗血清はSigma Chemical Companyから、ホルマリン-固定スチアフィロコックス プウレウス（Staphylococcus aureus）細胞は、Bethesda Research Laboratoriesから、プロトブロット（Protoblot）免疫スクリーニング検出液はPromegaから、オリゴヌクレオチド-指示（oligonucleotide-directed）突然変異誘発キットはAmershamから、Dulbeccoの座正必須培地及びウシ胎児血清はGibcoから、及び抗-ヒトトランスフェリンモノクローナル抗体hTF-14はCzechoslovakian Academy of Scienceから得た。他の試薬はすべて分析用か又はそれ以上の純度であった。

#### 方法

ヒト胎児トランスフェリン（hTF）cDNAの発酵 Dr. S. G. Orlin (Harvard University) 提供によるE. coli発現ベクターpKT-218（Prochownik, E. V. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**:1111-1114）を用いて、

ed Hughes Medical Institute, University of Washington）の提供による。合成後、オリゴヌクレオチドをC<sub>18</sub>逆相カラム上で精製した（Sep-Pak, Waters Associates; Atkinson, T. and Smith, M. (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, M. J., Ed.) pp86-81, IRL Press, Oxford). Taylor, J. W. et al. (1985) Nucleic Acids Res. **13**:5749-5754の方法を用いることにより、特定部位の突然変異誘発を行った。プラスミドDNAは、E. coli JM105から調製し、塩化セシウム密度勾配を用いた2連続遠心分離により生成した。

BRK細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDulbeccoの座正必須培地（DMEM）中で10-cmの皿当たり約10<sup>7</sup>細胞に成長させ、続いてSearle, P. F. et al. (1985) Mol. Cell Biol. **5**:1480-1489に記載のリン酸カルシウム法に法により10μgのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞を100μMのメトトレキレート（MTX）を含むDMEMに変え、生存細胞を500μMまで濃度に選別した。いくつかの実験では300μMのMTXを直接用いて細胞を選別した。大規模の回転培養は、100mLのDMEM+MTXを含むそれぞれ850cm<sup>2</sup>の組織培養中に約5×10<sup>7</sup>個の細胞を播種して開始した。2nSO<sub>4</sub>を0、0.8mMの最終濃度まで培養に加えることにより80%の集密度にて培養物を誘導した。細胞を48時間後に収穫した。

免疫沈降及びウェスタンブロッティング 細胞培養培地及び細胞ライケートの免疫沈降を, Van Oost, B. A. et al., (1986) Biochem. Cell Biol. 54: 699-705の方法により行った。沈降物を $\text{NaDodSO}_4$ の存在下における12%ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分析し(Laemmli, U. K., (1970) Nature (London) 227: 680-685)、その後ニトロセルロース膜上にブロッティングした。プロットを0.1 mg/mlのゼラチンを含むPBS中でインキュベートし、その後ヒツジ抗-hTF抗血清(PBS中で250-倍希釈)を用いて処理し、最後にアルカリホスファターゼ-置換ウサギ抗-ヒツジIgG抗体を用い、係結者の指示に従って発色した。

アミノ酸置換 3-フルオロチロシンを組み替えhTF/2N中のhTF-NMRプローブとして挿入するため、培養培地に培地中1%のL-チロシン濃度でD, L-m-フルオロチロシン(Sigma Chemical Company)を添加した。細胞はD, L-m-フルオロチロシンのない培地と同様にこの培地でも十分に成長した。

組み替えhTF/2Nの単離 収穫した培養細胞をフェニルメチルスルホニルフルオリド中で0.01%としてプロテアーゼを阻害し、培地中のトランスフェリンのすべてを飽和させるのに十分なFe(III)(NTA)を加えた。室温で攪拌した後、溶液を冷水透析水に対して24時間、その後M:1:1:1-Q複製系に対して長時間透析した。濃トリス-HCl緩衝液、pH8.4を5 mMの最終濃度まで加え、試料を遠心して管底を除去し、5.0 mMのトリス-HCl緩衝液、pH8.4で平衡化したDEAE-Sephacel(Pharmacia)のカ

ラム(2.5x80cm)に負荷した。5%~12%勾配ゲルを用いて $\text{NaDodSO}_4$ -PAGEを行い、Mahey, D. G. and Seef, U. S., (1978) Biochim. Biophys. Acta 452: 250-256の方法の修正版(Brown-Mason, A. and Woodworth, R. C., (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1

873)に従ってウレアー-PAGEを行った。110 mMのガラスカラム(LKB)中の0-50%スクロース勾配上で0.8%のPharmalyte, pH5-8(Pharmacia)を用いて電気泳動を行った。カラムは1000 Vにて2 mAの最終電流に overnight 泳動させた。

0.2 ml中の試料を勾配の半ばから回収した5 mlの溶液で希釈した。その後試料をカラムの等高電位領域に再注入し、墨中を24時間脱けた。勾配をカラムの底から1.5 mlの留分で集めた。各留分をA<sub>280</sub>及びpHに関して分析した。最高A<sub>280</sub>を有する留分を、アポー及び統一飽和タンパク質のpIを基準として選択した。

試料は、1 mMのNTA、1 mMのEDTA、0.5 Mの酢酸トリウムを含む緩衝液、pH4.9中でインキュベートすることにより、統一タンパク質から容易に除去できた。アポータンパク質をCenricor 1Q(Amicon)上で最小体積に濃縮し、その後水を用いて2回、及び0.1 NのKClを用いて2回希釈して再濃縮した。アポータンパク質は純水中で沈降する傾向があるが、0.1 MのKCl中に容易に再溶解した。アポータンパク質を $\text{NaHCO}_3$ 中で10 mMとし、465 nmで吸収を監視しながら高濃度のpH(NTA)まで滴定した。

組み替えhTF/2Nの定量的免疫検定 競争的固相免疫検定を用い、精製の様々な段階で培養中の組み替えhTF/2Nの濃度を評価した(Foster, W. B. et al., (1982) Thromb. Res. 28: 849-861)。タンパク質分解-誘導Fe-hTF/2N(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. 255: 703-713)を用いて放射ヨウ素化し(Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 842-857)、標準として用いた。モノクローナル抗-hTF抗体であるhTF-14をプローブとして用いた(Borick, J. et al., (1984) Folia Biol. (Prague) 30: 127-140)。この抗体はhTFのアミノ末端末端出部のみを認識し(Mason, A. B. et al., (1988) Br. J. Haematol. 68: 392-393)ウシトランスフェリンを認識しない(Penhalow, R. C. et al., (1986) J. Cell. Physiol. 128: 251-260)。

アミノ酸配列分析 組み替えhTF/2Nの非主変異型及び主変異型同方のアミノ酸配列をUniversity of VermontのGivens Analytical FacilityにてApplied Biosystems 470A Protein Sequencer上で決定した。

過ヨウ素酸-シッフ染色 組み替えhTF/2N中のオリゴ糖の存在を、タンパク質を過ヨウ素酸-シッフ試薬で染色することにより決定した(Fairbanks, G. et al., (1971) Biochemistry 10: 2605-2617)。

鉄置換基場スペクトル Camille and Henry Dryden NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermo

ラム(2.5x80cm)に負荷した。

その後カラムを同種配液中のNaClの濃度勾配(0-0.3 M)を用いて洗脱した。ピンク色を示す留分を $\text{NaDodSO}_4$ -PAGEにより分析し、組み替えタンパク質(Mr37,000)を含む留分を集めた。そのような留分は、細胞培養培地中のウシ胎児血清からのラントランスフェリン及びアルブミンも含む。集めた留分をAmicon PM-10膜上で5 mlに濃縮した後、タンパク質を、100 mMの炭酸水素アンモニウムで平衡化したSephadex G-75 Superfine(Pharmacia-PL Biochemicals)のカラム(2.5x80cm)上のクロマトグラフィーにかけた。

タンパク質からhTF/2Nを完全に分離するために、このカラムを通して2回目のクロマトグラフィー段階が必要な場合がある。この段階でA<sub>280</sub>/A<sub>260</sub>は通常<1.0であり、汚染ヘモタンパク質(おそらくヘモグロビン)の存在を示している。hTF/2Nは、50 mMのトリス-HCl, pH8.0中のNaClの濃度勾配(0-0.3 M)を用いたPolyacrylon S1(Pharmacia)のカラム(1x100cm)上で1 ml/分の流量にて1時間かけたPPLCにより最終的に精製して純質にした。1 mlの留分を集めた。タンパク質の統一結合状態に依存して2-4本のタンパク質バンドがカラムから離れた。

5%~12%勾配ゲルを用いて $\text{NaDodSO}_4$ -PAGEを行い、Mahey, D. G. and Seef, U. S., (1978) Biochim. Biophys. Acta 452: 250-256の方法の修正版(Brown-Mason, A. and Woodworth, R. C., (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1

880) J. Biol. Chem. 255: 703-713)を用いて放射ヨウ素化し(Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 842-857)、標準として用いた。モノクローナル抗-hTF抗体であるhTF-14をプローブとして用いた(Borick, J. et al., (1984) Folia Biol. (Prague) 30: 127-140)。この抗体はhTFのアミノ末端末端出部のみを認識し(Mason, A. B. et al., (1988) Br. J. Haematol. 68: 392-393)ウシトランスフェリンを認識しない(Penhalow, R. C. et al., (1986) J. Cell. Physiol. 128: 251-260)。

アミノ酸配列分析 組み替えhTF/2Nの非主変異型及び主変異型同方のアミノ酸配列をUniversity of VermontのGivens Analytical FacilityにてApplied Biosystems 470A Protein Sequencer上で決定した。

過ヨウ素酸-シッフ染色 組み替えhTF/2N中のオリゴ糖の存在を、タンパク質を過ヨウ素酸-シッフ試薬で染色することにより決定した(Fairbanks, G. et al., (1971) Biochemistry 10: 2605-2617)。

鉄置換基場スペクトル Camille and Henry Dryden NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermo

nt)における5, 872 Teasla Bruker WM NMR  
スペクトロメーターにて、4種検出 (quadrature detec-  
tion) を用いたフーリエ変換モードで操作してプロトン及びフッ  
素NMRスペクトルを得た。<sup>1</sup>Hプローブはその部門のDr. Chri-  
stian W. Hillenにより提供された。プロトンスペクト  
ルの場合、スペクトロメーターの設定は前記の通りであった (Valc-  
our, A. A. and Woodworth, R. C. (1987) Biochemistry 26: 3120-3125)。<sup>19</sup>Fスベク  
トルの場合、誘引磁は30, 000Hzであり、アキュイジション時間は  
0. 279秒であり、アキュイジションを15, 01s (90°) のパル  
スの間に2. 0秒のレシーバードレー (receiver delay) が介在し、試料は303°Kであった。<sup>19</sup>F化学シフトは<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O中の0  
14の三フッ化酢酸に対する。タンパク質試料は0. 1mlの99. 8  
原子%<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O中の6-8mgであり、スペクトルは<sup>1</sup>H<sub>2</sub>Oを含む容器内  
5mm NMR管に挿入された0. 1mlのカプセル中のこれらの試料  
につき測定した。<sup>19</sup>Fスペクトルの自由誘導減衰 (free indu-  
ction decay) につき、フーリエ変換の前に10Hzのライ  
ンブロードニングを行った。

#### 結果

**ヒトHIV-cDNAの転写** ハイブリッド形成プローブとしてヒト  
HIV-cDNAの5' 配列への24塩基オリゴヌクレオチドを用い、ヒ  
ト胚盤胞DNAライブラリ (Pachownik, E. V. et al. 3  
J. (1983) J. Biol. Chem. 258: 8389-839  
4) の約100, 000倍のコロニーをスクリーニングした。1例の陽

性コロニー中でありC18配列の複製及び転写を可能にし、SV40初期  
プロモーターにより誘導されたジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)  
cDNAの細胞培養物における選択を可能にすることが出来る。DH  
FR-cDNAは、競争的阻害剤メトトレキサート (MTX) に対する耐  
性力6270-倍強い細胞の突然変異株をコードする (Simonsen,  
C. C. and Levinson, A. D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2496-2499)。  
これは、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度 (0. 5mM)  
のMTX中で選択することを経験し、DHFRの不足した感受性  
細胞系の必要性を因する。

発現ベクターpNUT-hTF/2Nの構築のために、バクテリア発  
現ベクターからBamHI-HindIIIフラグメントを形成した  
(図1)。最初のトランスフェクションcDNAクローンからのHpaI  
-BamHIフラグメントも準備した (図1)。その後これらの2つの  
フラグメントを、AccI及びHindIIIを用いて切断したM13  
mp18複製可能形態DNA中に挿入した。得られた約13フラグから  
の複製可能形態DNAを分離し、XbaI及びHindIIIを用い  
て切断することにより挿入部を放出させ、末端を平滑末端とした。これ  
らの段階は、フラグメントが翻訳停止シグナルを含み、タンパク質のた  
めの天然のシグナル配列を保持し、最初のベクター中にあるdG/dC  
配列を含まないことを保証する (図1)。このフラグメントをSmall  
-insert pNUT中に挿入し、かくしてヒト成長ホルモン遺伝子はhTF  
/2NコードのcDNAと置換されるが成長ホルモン遺伝子からの転写停  
止シグナルはそのままだ。このプラスミドをBHK細胞中にトラン

性のコロニーを得た。このプラスミドから分離されたプラスミドの広範囲  
(extensive) 24塩基マッピングは、Yang, F. et  
al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2752-2756により同一のライブラリから分離されたヒト  
HIV-cDNAから予想されたパターンと完全に一致した。このクロ  
ンの5' -及び3' -末端のcDNA配列分析は、それがYang et  
al. により準備された全長クローンと同一であることを確認した。  
このcDNAの突然変異誘発及びサブクローニングの際に行われるその  
他の配列分析はすべて以前に報告された配列に正確に従った。

**ベクター構築及び発現** 2塩基翻訳停止コドン及び3塩基のHind  
III認識部位をhTF-cDNA配列のアミノ-及びカルボキシー末  
端ドメインの間のリンカー領域に、オリゴヌクレオチド-指示突然変異  
誘発により導入した。この構築物からの能産細胞配列は、前述hTF  
番号付け配列に従いAss-337で終わる (MacGillivray,  
R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 3543-3553)。

発現ベクターpNUT (Palmiter, R. D. et al. (1987) Cell (Cambridge, MA) 50: 435-442)  
はマウスメラノーマイン-1/セト成長ホルモン遺伝子融合物を含み、  
これは胎盤転換マウスにおいて多量のヒト成長ホルモンを誘導すること  
が示された (Palmiter, R. D. et al. (1983) Science (Washington, D. C.) 222: 809-8  
14)。このベクターの重要な機能的特徴には、マウスメラノーマイ  
ン-1プロモーターに重金屬の存在下でcDNA転写を誘導させ、5,

スプレクションし、得られた形質転換物をhTXの存在下で選択した。

トランスフェクションされたBHK細胞により製造されたmRNA転  
写物の分析のために、ホルムアルデヒドの存在下のアガロースゲル上で  
全RNAを電気泳動させた (Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab-  
oratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニ  
トセルロース上に移した後、ハイブリッド形成プローブとしてhGH  
遺伝子の3' 非翻訳領域に対するオリゴヌクレオチドを用いてブロット  
を分析した。トランスフェクションされた細胞系で約1. 4kbの誘導  
mRNAが検出されたが、突然変異BHK細胞では検出されなかった  
(データは示していない)。これはhGH 3' 非翻訳配列及びポリ (A)  
尾部を含むhTF/2N-mRNAの推定サイズと一致した。

形質転換されたBHK細胞により製造されたポリペプチドの分析のた  
めには、種々の細胞系の細胞ライセート及び溶媒の両方についてウェス  
タンブロット分析を行った (図2)。BHK細胞、hGH-pNUTプラスミド  
を含むBHK細胞及びhTF/2N-pNUTプラスミドを含む  
BHK細胞の試料をDME (BHK細胞) 又はDME+MTX (p-  
NUTベクターを含むBHK細胞) 中で培養した。細胞が集塊に達した  
ら培養の試料を採取し、細胞ライセートを調製した。これらの試料を順  
にヒジ抗-hTF抗血清及びホルマリン-固定S-Aウレウス (S,  
agrella) 細胞と共にインキュベートした (Van Oost, B.  
A. et al. (1986) Biochem. Cell Biol. 64: 699-706)。

## 特表平7-502723 (8)

Polysilicaと共にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させ、エトロセルロース膜に移すことにより結合タンパク質を分離した。その後膜をセツジ抗-hTF抗体血清及びアルカリホスファターゼと重合化したウサギ抗-hツジ免疫グロブリンと共にインキュベートした。BHK細胞からの細胞ライゼート又は培養(図2、1a列及び1b列)、あるいはhGH-pNUTプラスミドを含むBHK細胞からの細胞ライゼート又は培養(図2、2a列及び2b列)を分析すると、最初のセツジ抗-hTF抗体から予想されるhツジ免疫グロブリンバンド(Mr = 25,000及び30,000)及び少量の交叉反応物質のみが観察された。しかしhTF/2N-pNUTプラスミドを含むBHK細胞の細胞ライゼート(図2、3a列)又は培養(図2、3b列)中に、さらにMr = 37,000のバンドが観察された。このポリペプチドの分子量は、アミノ酸配列から算出されたhTF/2N分子の分子量(37,838)と非常に一致している。

hTF/2N生成物の等質性は、SDS-PAGE上で細胞ライゼート及び分泌液が再移動した際のシグナル配列の除去の成功を示す。沈降物中にhTFがほとんど現れないので抗-血清はhTFに特異性が高いことがわかる。

回転瓶で培養されるhTF/2N細胞系の大量培養の場合、培養中のhTF/2Nの濃度はラジオイムノアッセイにより検出して約10-15ng/mlであった。

**組み替えhTF/2Nの単離及び特異性** 組み替えhTF/2Nを3段階法により精製し、それはラジオイムノアッセイに基づいて80%の収率の主要形態のタンパク質を日常的に与える。Polyanion

Si上の最終的形態は、ウレア-PAGE(図3、パネルC)により確認される通り、タンパク質の非主要成分(<6%)及び主要成分(図3、パネルA)の両方のアホー及び統一輪形態を定量的に分離した。ウレア-PAGE上で最も移動の遅いバンドはアホー-hTF/2Nであり、移動の遅いバンドはhTF-hTF/2Nであることに注意してほしい。SDS-PAGEゲル(図3、パネルB)は、主要形態及び非主要形態の組み替えhTF/2Nが、等分子量の単分位であり、主要成分がPAS染色により炭水化物を含まない(データは示していない)ことを示した。

一般にこれらの試料は、既述の誘導hTF/2Nより優れた単分位性を有するようである(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713)(図3)。例えばクロマトグラフィのピークは前者の場合の方がより顕著的であり、ウレア-PAGE上のバンドの数は後者の方が多い。統一輪形態の組み替えタンパク質の場合のスペクトル比は、典型的に $A_{280}/A_{435} = 2.1$ 及び $A_{435}/A_{415} = 1.38$ であり、これにヒト前駆から単離された純粋なトランスフェリンニ族の割合に覆るとも等しくない。Fet(NTA)<sub>2</sub>を用いたアホータンパク質の3,684kDa単位の測定は、 $E_{435}/E_{415} = 2.1$ に対応する傾斜を与え、アホータンパク質の $E_{435}/E_{415} = 3.8$ ,8を示し(図4)、両方共、単一トランスフェリン分子として合理的な値である(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713; Zak, O. et al. (1983) Biochim. Biophys. Acta **742**:490-495)。アホー及びFet-h

TF/2Nの場合のpIはそれぞれ6.5及び6.4であった。

非主要及び主要形態の両方の組み替えhTF/2Nのアミノ酸配列分析は、血清からのホモ-hTFの場合に見いだされた結果と同一の結果を与えた(MacGillivray, R. T. A. et al. (1980) J. Biol. Chem. **255**:3543-3553)(表1)。

組み替えタンパク質のプロトンNMRスペクトル(図5)は、タンパク質分解-誘導hTF/2Nのスペクトルと非常に似ている(Vaioeur, A. A. and Woodward, R. C. (1987) Biochemistry **26**:3120-3125)が、組み替えタンパク質の場合の方が共振線は鋭い。hTF-チオレンを抽出した培養上で培養した細胞培養物から精製したタンパク質の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図6)は、4つの十分に分離した共振を示し、2つはおそらく未分離シールドを有する。

### 表1

ヒトトランスフェリン及び組み替えヒトトランスフェリンアミノ末端半分子のアミノ酸配列

タンパク質	アミノ酸配列	参照
ヒト血清トランスフェリン	V-P-D-K-T-V-R-R-C-A-T-S-	MacGillivray et al. (1983)
組み替えhTF/2N (主要)	V-P-D-K-T-V-R-R-R-T-A-R-S-	本報告

組み替え hTF/2N (非主要)

組み替えhTF/2N配列は、Applied Biosystems 470Aタンパク質シーケンサー上で決定した。約2000ppmの各試料を分析した。12シーケンサーサイクルを分析した。1サイクルで残基は決定されなかった；しかし分析の前にシステイン残基は修飾もなかった。6シーケンサーサイクルを分析した。

組み替えDNA法を用いることにより、いくつかの独立した基準で判断してタンパク質分解により誘導された種と同一の構造を有するhTF/2N分子を製造する。これは、この重要な鉄輸送タンパク質の機能的活性形態の、安定な細胞培養系における発現の初めての報告となる。

本文に記載のpNUTに基づくhTF/2N構築により、DPEF不足細胞系又は冗長な前駆増殖法を必要とせずに多量の組み替えタンパク質が製造された。BHK細胞は経済的火候換成育に十分適しており、実在数々はバイオリファクター産出中の培養媒体上の成長特性を試験中である。数リットルの容量を有する回転瓶又は発酵瓶のいずれかを用いることにより、従来高濃度のタンパク質を必要としてきたNMRのような方法に与え十分な組み替えタンパク質を容易に製造することができる。

Polyanion Si上で単離された非主要形態の組み替えhTF/2Nは、ウレア-PAGE上の移動が主要形態より遅い(図3、パネルC)が、SDS-PAGE(図3、パネルB)上では同速度である。従って見掛けの分子量は同一であるが6Mウレア中の変性の相対的程度が異なる。タンパク質分解-誘導hTF/2Nは6Mウレア中で



も移動の違い種を承すことに注意してほしい(図3、パネルC、部分g及びh)。

これらのゲル上での $\text{Phe-hTF}/2\text{N}$ によるアボ- $\text{hTF}/2\text{N}$ の汚染及びその避は、FPLC部分の収集法、フレイズル上における結合剤のいくつかの損失、及びFPLC試料の仕上げの間の汚染剤の除去から生ずる。同一のN-末端配列(表1)は、シグナルペプチドが本主要及び主要形態の組み替えタンパク質の両方から除去されたことを示す。ヒト血清からの $\text{hTF}/2\text{N}$ の場合と同様に(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:708-713)、組み替え $\text{hTF}/2\text{N}$ は非-グリコシル化である。 $\text{hTF}/2\text{N}$ の主要形態及び本主要形態の差の理由は現在未知である。本主要形態は合併の組み替えタンパク質の5%以上とならず、通常1%以下である。従って単分形組み替え $\text{hTF}/2\text{N}$ (主要形態)の単離は達成された。

組み替え $\text{hTF}/2\text{N}$ の鉄結合部位、 $\text{pI}$ 、 $\text{NaDodSO}_4$ -PAGE及びウレアー-PAGE上の移動、ならびにプロトンNMRスペクトルは、ナモリレンを用いたタンパク質分解によるアミノ末端 $\text{hTF}$ -鉄から誘導された $\text{hTF}/2\text{N}$ のものと、上記の点を除いて十分合致的に一致する(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:708-713; Valicourt, A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry* **26**:8120-8125)。タンパク質分解により誘導された $\text{hTF}/2\text{N}$ より主要形態の組み替えタンパク質は単分形性が高く(図3)、そのプロトンNMRスペクトルは鋭い

共振線を示す。非主要形態の量はNMRによる分析には不十分であった。

E. coliからのアルカリホスファターゼ中の $m$ -フルオロロキシンの挿入の以前の研究は、タンパク質中のチロシル残基を特異的に標識するための $^{14}\text{C}$ -NMRの有用性を確立した(Sykes, B. D. et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:469-473; Huil, W. E. and Sykes, B. D. (1974) *Biochemistry* **13**:3431-3437)。組み替え $\text{hTF}/2\text{N}$ 中の $m$ - $\text{P}$ -チロシンの挿入により、この細胞培養系において選択的アミノ酸置換が可能であり、チロシル残基の特異的NMRプローブへの方法を与えることが証明された。この試料は非-置換組み替え体に関して上記で記載した通り、非-置換タンパク質とすべての点で同様に移動する。多量の挿入の達成のために細胞培養条件を最適化した場合、常磁性及び阻磁性金属を添加した時、及び $\text{pH}$ を変化させた時の $^{14}\text{C}$ -NMRスペクトルの変化は、金属結合に特異的に含まれるチロシル残基の研究に有用であろう。選択的に $\gamma$ -アセチル化した卵管胚アミノ酸の挿入は、日本マウスからのサゾチンに関する研究と同様の方法でタンパク質のプロトンNMRスペクトルの芳香族領域の分析を可能にするであろう(Brown-Mason, A. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**:1506-1509)。

11. カルボキシル基末端部を含む組み替えトランスフェリン半-分子の製造

$\text{hTF}$ のカルボキシル基末端部のコード配列を含む $\text{SmaI}$ 制限フラグメントを、全长 $\text{hTF}$ - $\text{cDNA}$ から導出し、PCR-指示突然変換誘

発の誘発として用いた(図2)。PCRプライマーとして用いるために2個のオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴ1は、 $\text{SmaI}$ 制限部位をコードし、 $\text{hTF}$ の天然のシグナル配列をコードする配列が続き、アミノ酸334-341のコード配列と合わない配列が続いた。第2のオリゴヌクレオチドは $\text{hTF}$ - $\text{cDNA}$ の3' 非翻訳領域の増幅体と合わきり、正常な翻訳停止部位に $\text{SmaI}$ 制限配列3'を導入する。(Valicourt, F. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:2762-2766)による番号付けを用いてヌクレオチド2125-2127)。Tagポリメラーゼ(perkin Elmer)を用いた25回のPCR増幅は、所望の $\text{DNA}$ フラグメントを与え、それは $\text{hTF}$ の天然のシグナル配列をC末端部コード配列にスプライシングする。このフラグメントをその後 $\text{SmaI}$ で消化し、 $\text{hTF}/2\text{N}$ 発現研究の場合と同様に $\text{cDNA}$ の6 $\text{SmaI}$ フラグメントと連結した。

11.1. 組み替え全長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためのコード配列を、上記のヒト肝臓ライブラリから導出した全-長 $\text{cDNA}$ クローンから誘導した制限酵素消化フラグメントから組み立てた。最初のクローンの基となるプラスミド(pMT-218)のユニーク制限酵素認識部位の数が限られていたため、簡便なベクター中にコード配列を導入するために一連のクローニング段階が必要であった。この過程は、 $\text{cDNA}$ の3'末端からの $\text{HpaI}/\text{BamHI}$ フラグメントのベクター $\text{pUC18}$ へのクローニングにより開始された(Messing, J. (1983) *Meth. Enzymol.* **110**:20-28)。得られたプラスミドを $\text{BamHI}$

1及び $\text{HindIII}$ で消化し、ヒトトランスフェリン $\text{cDNA}$ からの $\text{BamHI}/\text{HindIII}$ フラグメントを最初のフラグメントに挿入してクローニングした。得られたプラスミドをその後 $\text{HindIII}$ 及び $\text{PstI}$ で消化し、トランスフェリン- $\text{cDNA}$ の3'末端からの最終的 $\text{HindIII}/\text{PstI}$ フラグメントをクローニングし、全-長コード配列の組み立てを完了した。 $\text{N}$ -及び $\text{C}$ -末端トランスフェリン半-分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドを $\text{SacI}$ 及び $\text{SphI}$ で消化すると、1個の制限フラグメントとして全-長コード配列を放出し、続いてそれを $\text{DNA}$ ポリメラーゼ及び $\text{dNTP}$ を除いて単消化し、その後 $\text{cDNA}$ の6 $\text{SmaI}$ フラグメントにクローニングした(Patterson et al. (1987) *Cell* **50**:435-448)。

プラスミド $\text{DNA}$ はE. coli JM105から複製し、塩化セシウム勾配を用いた2連続密度段階により精製した。ペピーハムスター腎臓(OKK)細胞を、10%の胎児血清を含むDulbeccoの修正Eagle媒体-Ham's F-12栄養剤混合液(DMEM-F-12)(Gibco:Sigma)中で100- $\text{mm}$ の相当たり約 $10^7$ 細胞に底肉し、続いてSerice, P. F. et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**:1489-1489に記載のリン酸カルシウム共沈法により10 $\mu\text{g}$ のプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞を500 $\mu\text{M}$ のメトトレキサート(MTX)を含むDMEM-F-12に置き、プラスミド含有細胞を選択した。選択したら、 $\text{cDNA}$  (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むリン酸塩緩衝食塩水を用い、細胞を約30%の換密度にて5個の100 $\text{mm}$ 底に、

その後の4回のT-175プラスコは、最後は5回の広葉菌菌回転瓶（それぞれ200ml）に順次に通過させた。T-175通過の際に、フェノール赤を含まないDMEM-F-12中のウシ胎児血清の代わりに血清代替、UltraSer-G(Gibco)を1%の量で用いた。

1度生細胞が高くなると（約100μg/mlあたり）、UltraSer-Gを含まない培地が少なくとも2回通過の間、組み替えタンパク質の製造を維持できることが見いだされた。これは発見された金一長組み替えヒト胎血トランスフェリンの状態を非常に簡略化した。組み替えタンパク質の増殖のために、4日後した培養培地をフェニルメタンスルホニルアラギン酸及びナトリウムアラジドに関して0.01%とし、それぞれプロテアーゼ及びバクテリア成長を阻害する。浮遊するトランスフェリンの細胞に十分なpH（ニトロトリ酢酸）を加える。培地の体積を<10mlに減少させ、組み替えアミノ酸類にトランスフェリン単一分子に関して配対したアニオン交換カラム（Phyllyanion Q1, 1×15cm）上を通過させることにより精製する。上記参照。

単離された組み替え金一長ヒト胎血トランスフェリンはこのカラム上で、グリコシル化バクテリアの産物によるいくつかの異質性を示す。タンパク質はNaDodSO<sub>4</sub>-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関して単分散であり、精製ヒト胎血トランスフェリンと同等のスペクトル及びスペクトル比を有する。

#### IV突然変異体トランスフェリンの製造

野生型（本発明）の製造の従来の単一文字アミノ酸記号、それに続いて一次配列中の置換の位置番号、（この場合成熟タンパク質のバリンを位置1と指定する）、及びそれに続く置換残基の記号を用いることにより

置換突然変異体を指定する。例えば位置83のアスパラギン酸残基がセリン残基により置換された変異体は、D83Sと指定される。

αTF/2N変異体の製造は、2通りの方法で行った。D81S置換体は、Nelson, R. M. and Long, G. L. (1989) Anal. Biochem. **180**: 147-151の方法を用いて製造した。簡単に述べると、αTF/2Nコード配列の5'末端からのBpa: I/BamHIフラグメントをpUC18中にサブクローニングし、その後PCRに基づく2段階突然変異誘発法の典型として使用した。得られたDNAフラグメントをその後M13mp18中に再クローニングし、突然変異体産物の配列をジデオキシ配列分析により確認した。その後フラグメントを、Xba I及びBam HIで消化することにより2本鎖形態の配列決定ベクターから放出し、最初のαTF/2N産物からのBam HI/Hind IIIフラグメントに遊離して全長D81S-αTF/2Nコード配列を製造し、このスプライシングの忠実度を制限消化分析により確認し、その液相と同様にαNUT中にクローニングした。

金αTF/2Nコード配列をM13mp18にサブクローニングし、その後それをオリゴヌクレオチド指示突然変異誘発（Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) Meth. Enzymol. **100**: 458-600）の典型として用い、duffy, ung'選択液（Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 488-492）を用いることにより、置換突然変異体D65R、D63C、K206Q及びH207Eを製造した。突然変異誘発の後、突然変異体配列のための全コード配列を、2

50bp間隔でコード配列の長さによって断片的に配列決定プライマーを用いたジデオキシ配列分析により確認した。その後所望のコード配列を、制限消化により放出し、平末端化し、前記の通りαNUT中に挿入した。

a) 金一長ヒト胎血トランスフェリン（αTF）及びb) アミノ-末端半一分子（αTF/2N）の種々の特定部位の突然変異体のためのc) DNAを含むpNUTプラスミドが構築された。これらの突然変異体は、1) ヒト胎血トランスフェリンのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づくD63S、2) 英明の患者からのαTFのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づくQ65R、c) ニトロトリ酢酸からのオゴトランスフェリン（αTF）中のC-末端半分の野生型突然変異に基づくK206Q、d) ヒトラクトフェリン（hLTF）中の野生型突然変異に基づくH207E、及びe) 鉄結合部位の金属選択性を調べる試みとしてのD63Cを含む。これらの産物はすべてペディハルスター腫瘍細胞の安定な形質転換物中で、10-100mgの組み替えタンパク質の量で発現された。さらにαTFのための全長cDNA及びαTF/2N-αTF/2CならびにαTF/2N-βTF/2CのためのキメラcDNAを含むαNUTプラスミドが構築された。

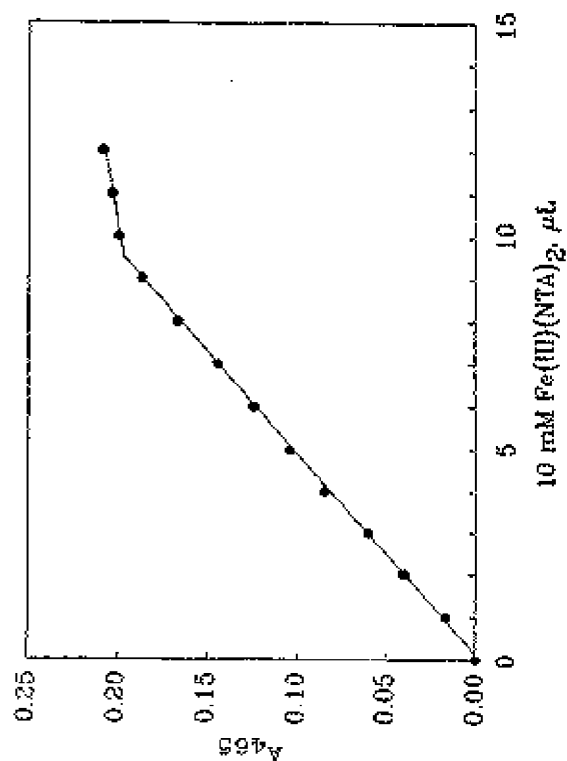
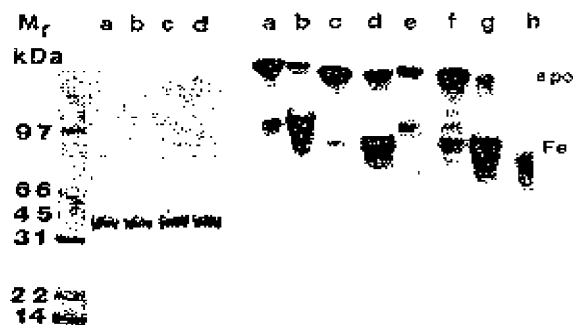
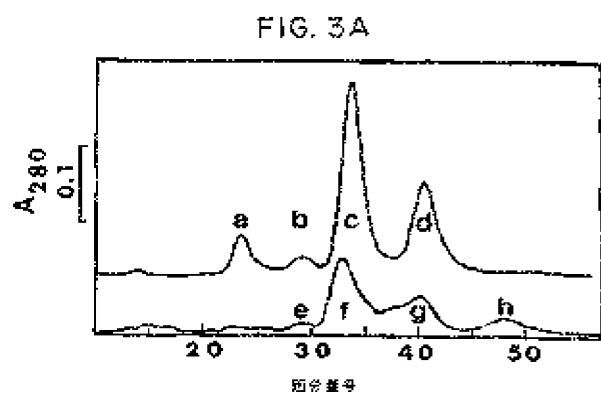
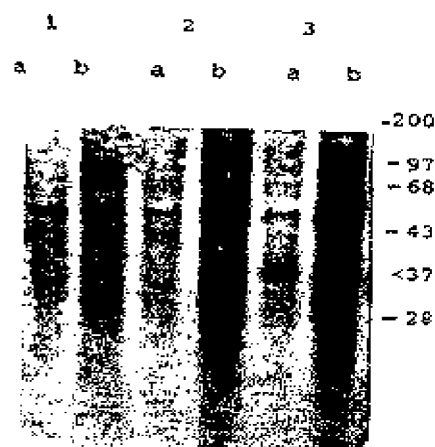
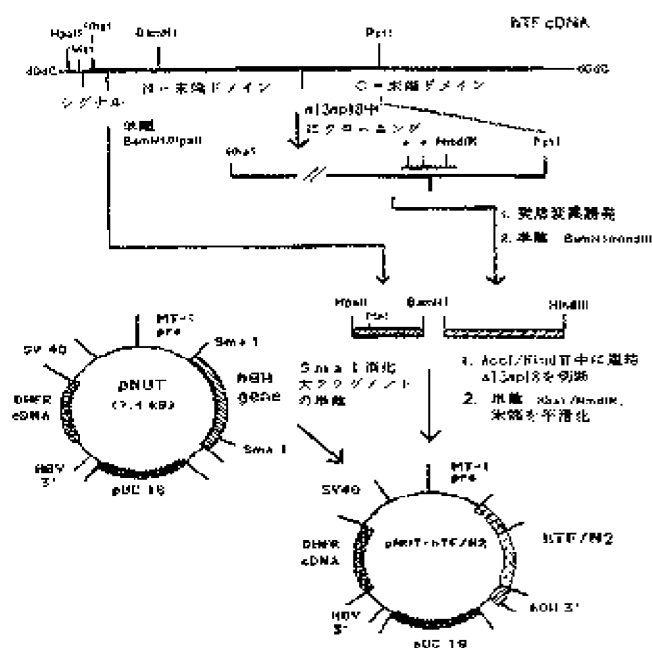
特定部位の突然変異体の特性には、D63S突然変異体は鉄と結合するが（文献中の推測に反して）野生型タンパク質よりずっと弱くであることが含まれる。例えばこの突然変異体は、8Mウレアを含むpAG12ゲルにおける電気泳動にてその結合を失うが、野生型はその結合を保持している。可視スペクトルの最大は422nmにあり、野生型の470nmと対照的である。Q65R突然変異体は、野生型より鉄との

結合が弱く、470nmに可視スペクトルの最大を有する。K206Q突然変異体は、そのモデルであるαTF/2Cと同様に野生型よりずっと強く鉄と結合する。野生型タンパク質の市售は、それぞれ1mMのEDTA及びNTAを含む0.5M酢酸緩衝液、pH4.8中で非常に速速に消えるが、突然変異体は全く色を失わず、その結合鉄を放出するためにはpH4及び1mMのデフォロキサミンが必要である。アポ-突然変異体は、鉄との再結合が野生型タンパク質より遅いようである。この突然変異体の場合の可視スペクトルの最大は460nmにある。

全長組み替えαTFは、S<sub>0</sub>とS<sub>1</sub>-PAG12上で血清-腫瘍タンパク質と同速度で移動する。

#### 同定法

当該技術における熟練者は、本発明に記載の特定の方法に関する多数の同等物を日常的実験のみを用いて認識する、又は導き出せるであろう。そのような同等物は本発明の範囲内であり、以下の請求の範囲に含まれると考えられる。



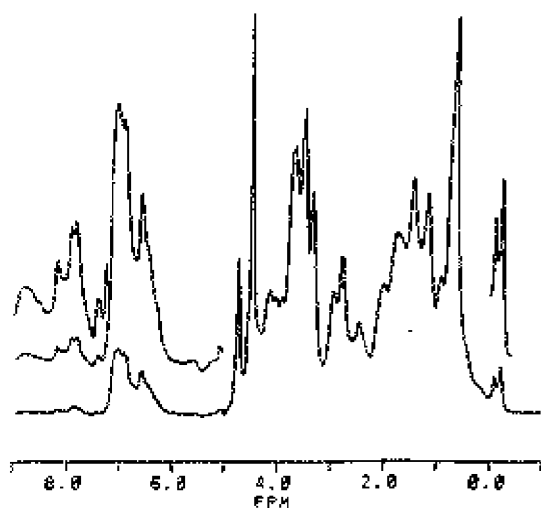


FIG. 5A

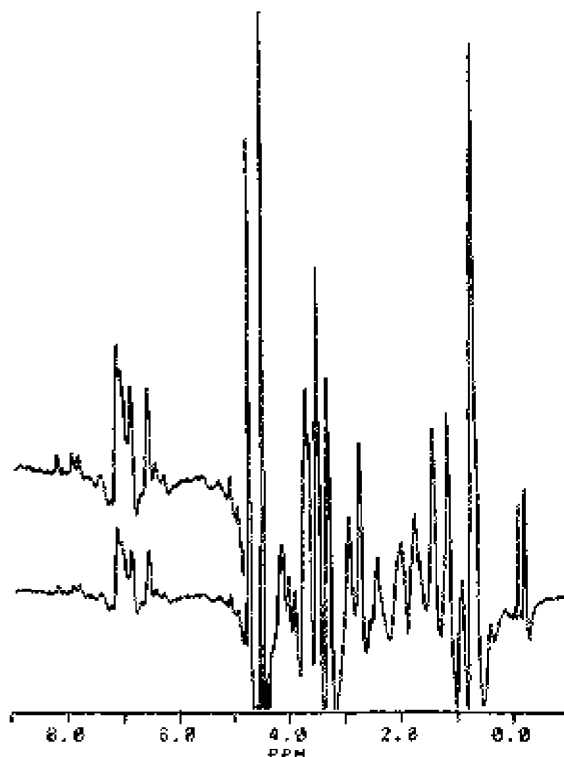


FIG. 5B

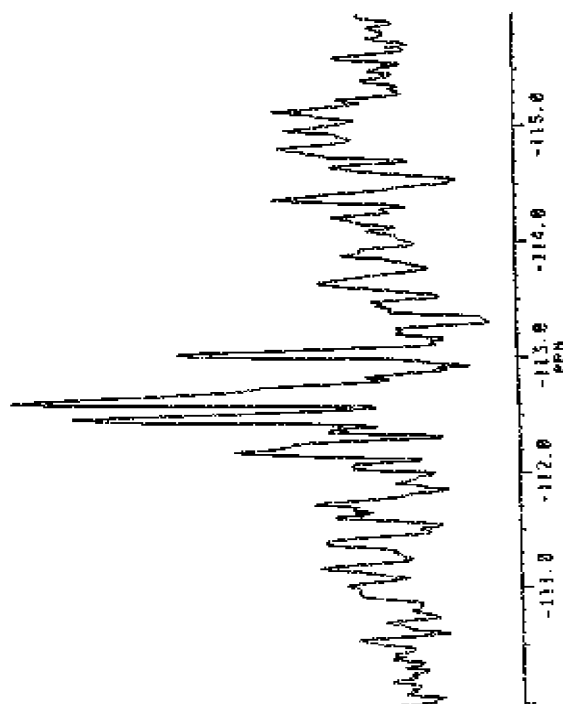


FIG. 6

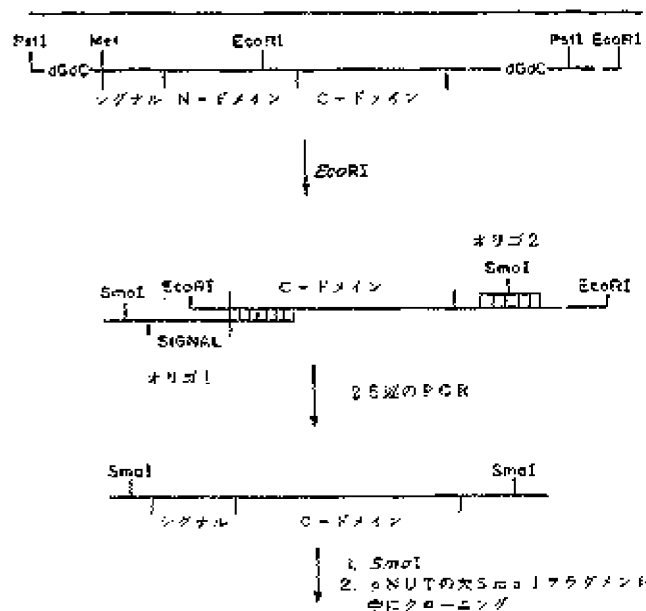


FIG. 7

補正書の写し(翻訳文) 発明者 (特許法第184条の8)

請求の範囲

平成5年8月6日 出願

特許庁長官 麻 生 渡 殿

## 1. 特許出願の番号

PCT/US92/00928

## 2. 発明の名称

縮み変えトランスフェリン、トランスフェリン半-分子、  
及びそれらの突然変異体

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国バーモント州05405バーサントン  
(當地なし)名 称 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・ステイト・  
アグリカルチュラール・カレッジ (ほか1名)

## 4. 代理人

〒107 東京都港区赤坂1丁目5番13号

日本自転車会館

氏 名 (6078)井原正 小 岡 昌 平 吉

電 話 3583-2256



## 5. 補正書の提出年月日

1993年5月4日

## 6. 補正書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



治療的組成物。

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリンの基本的には特異な組成物。

10. 他のヒト血清タンパク質を含まない鉄-結合ヒト血清トランスフェリンの基本的には特異な組成物。

11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を、トランスフェリンを発現させる条件下で培養し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機能的活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

12. ベクターがプラスミドDNAである、請求の範囲11に記載の方法。

13. 真核細胞がベビーハムスター腎臓細胞である、請求の範囲11に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの誘導可能プロモーターに作動的に結合した、トランスフェリン又はその一部をコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を培養し、

b) プロモーターを誘導してトランスフェリンの発現を誘導し、

c) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機能的活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

15. プロモーターが亜鉛誘導可能メタロチオネインプロモーターである、請求の範囲14に記載の方法。

16. a) 請求の範囲12に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞をトランスフェリンを発現させる条件下で培養

し、哺乳類トランスフェリンのアミノ末端を含む突出部とは別に基本的に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含む突出部を含む、機能的活性トランスフェリン半-分子。

2. 少なくともトランスフェリンの1つの突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まず、突然変異体が金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合力より強い結合力を有する、機能的活性突然変異体哺乳類トランスフェリン半-分子。

3. 鉄に対して天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、請求の範囲2に記載の突然変異体トランスフェリン半-分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1つの突出部の金属-結合ドメインを含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲3に記載の突然変異体トランスフェリン半-分子。

5. 少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含むトランスフェリンの1つの突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まない哺乳類トランスフェリンの機能的活性半-分子を金属の濃度を濃度以下に下げるのに十分な量で含む、金属キレート化治療で用いるための治療的組成物。

6. 金属が鉄である、請求の範囲5に記載の治療的組成物。

7. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンより濃く金属に結合する突然変異体である、請求の範囲6に記載の治療的組成物。

8. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲7に記載の

し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリン。

## 国際調査報告

<p>1. <b>Classification of the Invention</b> (按ずる発明の分類)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to any other classification system</p> <p>IPC Class. A 61K 35/00, C 07K 30/00</p> <p>US Class. 354/254, 354/255</p>	
<p>2. <b>Priority Claims</b> (優先権の主張)</p> <p>Priority of Invention (発明の優先権)</p> <p>Country (国) Japan (日本)</p> <p>No. (番号) 54476, 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>3. <b>Background of the Invention</b> (発明の背景)</p> <p>Information regarding the state of the art (従来技術に関する情報)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>4. <b>Summary of the Invention</b> (発明の要約)</p> <p>Summary of the Invention (発明の要約)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>5. <b>Claims</b> (請求項)</p> <p>Claims (請求項)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>6. <b>References</b> (参考文献)</p> <p>References (参考文献)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>7. <b>Remarks</b> (備考)</p> <p>Remarks (備考)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	

<p>8. <b>Observations</b> (観察)</p> <p>Observations (観察)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>9. <b>Remarks</b> (備考)</p> <p>Remarks (備考)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	

<p>10. <b>Observations</b> (観察)</p> <p>Observations (観察)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	
<p>11. <b>Remarks</b> (備考)</p> <p>Remarks (備考)</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p> <p>App. (出願): 520/754, 418/10, 1 525/76 29, 70</p>	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 P 21/02	Z N A	C 9282-4 B	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
	8412 -4 B		
		C 1 2 N 5/00	B
		//( C 1 2 N 15/09	Z N A A
		C 1 2 R 1:91)	
(72)発明者 フランク、 ウォルター・デイ		(72)発明者 メイソン、 アン・ビー	
アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・		アメリカ合衆国バーモント州05445シヤー	
アパートメント2262・オードリアロード		ロツテ・ノースグリーンブツシユロード	
11991		(番地なし)	
(72)発明者 マツギリブレイ、 ロス・テイ・エイ		(72)発明者 ウツドワース、 ロバート・シー	
カナダ国ブイ6テイ 1テイ7・ブリテイ		アメリカ合衆国バーモント州05482シエル	
ツシユコロンビア・バンクーバー・アリソ		バーン・ローガンレイン4	
ンロード2233・アパートメント807			